علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۵، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۳ (ص ۲۹۶-۲۸۹)

اثر افزودن ال-گلوتامین به رقیق‌کنندهٔ تریس بر انجماد اسپرم پوشش‌دارشدهٔ قوچ تالشی

ساناز حسن‌پور[1]، محمد روستایی علی‌مهر[2]* و مهرداد محمدی[3]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیاران، گروه علوم دامی دانشکدهٔ علوم کشاورزی دانشگاه گیلان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۵- تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۷/۱۷)

چکیده

آزمایش به‌منظور بررسی اثر ال-گلوتامین بر انجماد اسپرم پوشش‌دارشده با استفاده از چهار رأس قوچ انجام گرفت. منی با استفاده از واژن مصنوعی متصل به لولهٔ حاوی تریس-فروکتوز- ۱۵ درصد زردهٔ تخم‌مرغ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها تجمیع و سانتریفیوژ شدند. پس از حذف مایع فوقانی و رقیق‌سازی رسوب، نمونه‌ها به پنج قسمت تقسیم شدند و به آن‌ها مقدار صفر، ۴۰، ۸۰، ۱۲۰ و ۱۶۰ میلی‌مول ال-گلوتامین اضافه شد. نمونه‌ها با استفاده از نیتروژن مایع منجمد و بعد از دو هفته یخ‌گشایی شدند. بعد از یخ‌گشایی و ذخیره‌سازی در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، تحرک پیش‌رونده، سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی (هوخست بیس بنزامید ۳۳۲۵۸) و سلامت غشای آکروزومی (آلکسافلور-PNA-۴۸۸) پس از صفر، سه، شش و نه ساعت بررسی شدند. اثر مستقل ال-گلوتامین نشان داد زنده‌مانی اسپرم در مقدار صفر (۳۵/۹۵ درصد)، ۴۰ (۴۰/۶۵ درصد) و ۸۰ (۴۵/۹۵ درصد) میلی‌مول بیشتر از۱۶۰ میلی‌مول ال-گلوتامین بود (۳۰/۴۰ درصد، $P<۰/۰۵$). اثر متقابل ال-گلوتامین و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک پیش‌رونده و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم معنادار بود ($P<۰/۰۵$). سه ساعت پس از یخ‌گشایی، بیشترین سلامت غشای پلاسمایی (به ترتیب ۴۹/۲۵ و ۴۷/۳۴ درصد) در مقدار ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). نه ساعت پس از یخ‌گشایی، بیشترین تحرک پیش‌روندهٔ اسپرم (۲۶/۴ درصد) در مقدار ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). بنابراین افزودن ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین به رقیق‌کنندهٔ تریس-گلیسرول (۵ درصد) سبب بهبود ماندگاری اسپرم پوشش‌دار شد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم پوشش‌دارشده، ال-گلوتامین، انجماد، قوچ تالشی.

مقدمه

در گوسفند و گاو محل تخلیهٔ منی در هنگام جفت‌گیری انتهای مهبل است، بنابراین اسپرم‌ها به‌واسطهٔ توانایی تحرک از سد گردن رحم عبور می‌کنند و به‌سرعت از مایع منی جدا می‌شوند. در هنگام ذخیره‌سازی منی برخلاف آنچه در زمان جفت‌گیری طبیعی اتفاق می‌افتد، ناخواسته زمان مجاورت اسپرم و مایع منی افزایش می‌یابد. به منظور کاهش آثار مخرب مایع منی بر اسپرم در زمان ذخیره‌سازی، رقیق‌کردن منی با رقیق‌کنندهٔ مناسب ضروری به نظر می‌رسد (Manjunath & Therien, 2002). به علاوه مشخص شده است حذف مایع منی به کمک روش پوشش‌دارکردن[1] اسپرم قبل از ذخیره‌سازی منی سبب بهبود کیفیت اسپرم می‌شود (De Pauw *et al*., 2003; Roostaei-Ali Mehr &

* تلفن: ۰۹۱۱۱۳۵۵۲۶۲
Email: roostaei@guilan.ac.ir
1. Coating

Sharafi, 2013; Mohammadi-Nohdehy & Roostaei-Ali Mehr, 2013). در روش پوشش‌دار کردن اسپرم، نمونه‌های منی از ابتدا (زمان انزال) در لولهٔ حاوی بافر به علاوهٔ زردهٔ تخم مرغ (حداقل ۱۵درصد) جمع‌آوری و سپس مایع منی با کمک سانتریفیوژ حذف می‌شود (De Pauw *et al*., 2003).

انجماد فرآیندی است که با کاهش متابولیسم سلول سبب افزایش ماندگاری آن می‌شود (Forouzanfar *et al*., 2007). انجماد اسپرم زمینه را برای ذخیرهٔ ژن‌ها، استفاده از نرهای برتر، جابه‌جایی منی و استفاده از این فرآوردهٔ بیولوژیک در زمان‌ها و مکان‌های مختلف فراهم می‌کند؛ البته انجماد سبب کاهش تحرک و باروری اسپرم بعد از یخ‌گشایی می‌شود (Bergeron & Manjunath, 2006).

ویژگی‌های ساختاری گردن رحم میش و خسارت‌های جدی به اسپرم قوچ در روند انجماد و یخ‌گشایی سبب محدودیت در استفاده از منی منجمد در تلقیح مصنوعی گله‌های گوسفند شده است (Cseh *et al*., 2012) بنابراین بررسی اثر افزودنی‌های مناسب با خاصیت سرمامحافظ در روند انجماد اسپرم قوچ ضروری به نظر می‌رسد (Bucak *et al*., 2009).

اسید آمینهٔ ال-گلوتامین سرمامحافظ نفوذناپذیر با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که برای انجماد اسپرم گونه‌های مختلف پستاندار از جمله میمون و انسان به کار رفته است (Renard *et al*., 1996; Li *et al*., 2003). گزارش شده است که ۱۰میلی‌مول ال-گلوتامین و ۸درصد لیپوپروتئین با دانسیتهٔ پایین (LDL[1]) سبب بهبود تحرک اسپرم گاو پس از انجماد و یخ‌گشایی می‌شود (Amirat-Briand *et al*.,2009). به علاوه ۲۵ میلی‌مول ال-گلوتامین و ۸درصد LDL سبب افزایش تحرک اسپرم بز بعد از یخ‌گشایی شده است (Al Ahmad *et al*., 2008). همچنین استفاده از ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین در روند انجماد منی الاغ سبب افزایش تحرک اسپرم پس از یخ‌گشایی شد (Trimeche *et al*., 1999).

تاکنون فقط در یک مطالعه از ال-گلوتامین به‌عنوان مادهٔ آنتی‌اکسیدان در مقادیر بسیار کم (کمتر از ۵ میلی‌مول) استفاده شده است (Bucak *et al*., 2009) و هنوز بهترین میزان ال-گلوتامین برای انجماد اسپرم پوشش‌دارشدهٔ قوچ مشخص نشده است. هدف از این پژوهش بررسی اثر مقادیر مختلف اسید آمینهٔ ال-گلوتامین برانجماد اسپرم پوشش‌دارشدهٔ قوچ تالشی طی انجماد است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق با استفاده از چهار رأس قوچ تالشی با متوسط وزن ۵±۵۰ کیلوگرم و میانگین سنی ۲/۵ تا ۴ سال و یک رأس میش با وزن ۳۵ کیلوگرم و سن ۳سال از اوایل تا اواسط پاییز ۱۳۹۰ در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه گیلان صورت گرفت. روزانه ۱۳۰۰ گرم یونجهٔ خشک، ۵۹۰ گرم جو و ۶۲۰ گرم کاه در دو وعدهٔ خوراک صبح و شب در اختیار دام‌ها قرار گرفت. در طول آزمایش نمک و آجر لیسیدنی (مکمل مواد معدنی) به‌صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار گرفت.

جمع‌آوری منی

نمونه‌های منی دو بار در هفته به فاصلهٔ دو روز و به کمک واژن مصنوعی جمع‌آوری شد. جهت پوشش‌دارکردن اسپرم، انزال دوم در لولهٔ حاوی تریس- فروکتوز [تریس-(هیدروکسی متیل)- آمینومتان ۳/۲۵۸g، اسید سیتریک مونوهیدرات ۱/۸۷۰g، فروکتوز ۰/۹۳g و جنتامایسین (۵۰ mg/mL) ۰/۵ میلی‌لیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH=۷] و ۱۵درصد زردهٔ تخم‌مرغ (حجم/ حجم) جمع‌آوری و به وسیله فلاسک عایق حاوی آب ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد. در مجموع بیست انزال در پنج نوبت جمع‌آوری شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها

در آزمایشگاه نمونه‌های منی از نظر تحرک پیش‌رونده و غلظت اسپرم بررسی شدند و نمونه‌هایی که تحرک پیش‌روندهٔ کمتر از ۸۰ درصد و غلظت کمتر از $۲/۵ \times ۱۰^{۹}$ داشتند، از آزمایش حذف شدند. نمونه‌های منی تجمیع و ۱۰دقیقه با قدرت ۷۰۰×g در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ مایع رویی حذف شد و رسوب به وسیلهٔ رقیق‌کنندهٔ تریس-گلوکز [تریس-(هیدروکسی‌متیل)-آمینومتان ۳/۶۳۴g، اسیدسیتریک مونوهیدرات ۱/۹۹۶ g، زردهٔ تخم مرغ ۱۵درصد و

1. Low density lipoprotein

جنتامایسین ۲۵۰mg در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH=۷] تا غلظت $۱/۲×۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر رقیق شد. نمونه‌ها به پنج بخش مساوی تقسیم شدند و هر بخش به صورت ۱:۱ (حجم/ حجم) با تریس حاوی ۱۰درصد گلیسرول و صفر (کنترل)، ۸۰، ۱۶۰، ۲۴۰ و ۳۲۰ میلی‌مول ال-گلوتامین (AppliChem Germany) مخلوط شد و در نهایت غلظت گلیسرول به ۵ درصد، اسپرم mL/ $۶۰۰×۱۰^{۶}$ و ال-گلوتامین صفر، ۴۰، ۸۰، ۱۲۰ و ۱۶۰ میلی‌مول رسید. نمونه‌ها در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری بسته‌بندی شدند و انتهای هر کدام با پودر پلی ونیل الکل مسدود شد. نمونه‌ها به دستگاه سردکننده (Test Chamber EG53AH, KATO, Japan) منتقل شده، با سرعت ۰/۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد بر دقیقه تا ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سرد شدند و ۲ ساعت دیگر در همین دما برای رسیدن به تعادل نگهداری شدند.

انجماد و یخ‌گشایی

پایوت‌ها ۱۳ دقیقه به فاصلهٔ ۴ سانتی‌متر از سطح نیتروژن مایع قرار داده شده و سپس در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. نمونه‌ها ۲ هفته در تانک نیتروژن مایع ذخیره شدند. تمام این مراحل پنج مرتبه به‌صورت مجزا تکرار شد.

چهار پایوت از هر تیمار (جمعاً ۲۰ پایوت) در هر تکرار، به مدت ۲۰ ثانیه در ظرف آب ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس ۹ ساعت در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد (Jal, Iran) نگهداری شدند. میزان تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای اسپرم و سلامت آکروزوم در صفر، ۳، ۶ و ۹ ساعت پس از یخ‌گشایی ارزیابی شد.

ارزیابی اسپرم

ارزیابی تحرک نمونه‌ها، با قراردادن ۵ میکرولیتر از منی روی لام با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و گذاردن یک لامل روی آن انجام گرفت. سپس با استفاده از میکروسکوپ اختلاف فاز با بزرگ‌نمایی ۴۰۰× و مجهز به صفحهٔ گرم با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، تحرک ۲۰۰ سلول اسپرم با اختلاف ۱۰ درصد در حداقل ۵ میدان دید تخمین زده شد و در انتها میانگین حاصل از این تخمین‌ها به‌عنوان درصد تحرک پیش‌رونده ثبت شد (Bucak *et al*., 2009).

برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم از محلول هایپواسموتیک (سیترات سدیم دی‌هیدرات ۰/۷۳۵g و فروکتوز ۱/۳۵۱g در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH=۷) استفاده شد (Jeyendran *et al*., 1992). ۵μL منی با ۵۰μL از محلول هایپواسموتیک مخلوط و ۳۰ دقیقه درون انکوباتور در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۲۰۰ اسپرم حداقل در ۵ میدان دید زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰۰× بررسی شد. اسپرم‌های دارای دم متورم به‌عنوان پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌های با دم بدون تورم به‌عنوان پاسخ منفی (غشای پلاسمایی ناسالم) در نظر گرفته شدند.

برای ارزیابی زنده‌مانی اسپرم از رنگ هوخست H33258 (AppliChem, Germany) استفاده شد (de Leeuw *et al*., 1991). به‌طور خلاصه حجم مساوی از نمونه و محلول ۲ درصد گلوتار آلدهید در بافر فسفات (سدیم کلرید ۱۳۷mM، پتاسیم کلرید ۲/۷ mM، سدیم هیدروژن فسفات ۸/۱ mM، پتاسیم هیدروژن فسفات ۱/۵ mM، pH=۷) مخلوط و ثابت شد. ۲۰ μL۰ از محلول رنگ هوخست در ۱۵۴ mMسدیم کلرید و ۱۵ mM تری سدیم سیترات pH=۷) به نمونه اضافه شد و بعد از ۵ دقیقه در دمای اتاق ۵μL از نمونه روی لام قرار داده شده و با گذاشتن لامل روی آن، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus, Japan) و فیلتر UW، ۲۰۰ اسپرم با بزرگ‌نمایی۴۰۰× در شرایط نور بسیار کم بررسی شد. اسپرم‌های با تلالؤ آبی‌رنگ به‌عنوان پاسخ منفی (مرده) و اسپرم‌های بدون رنگ به عنوان پاسخ مثبت (زنده) در نظر گرفته شدند.

ارزیابی سلامت غشای آکروزوم، با استفاده از رنگ آلکسافلور-۴۸۸-PNA (Molecular Probes, USA) و بر اساس روش Varisli *et al*. (2009) صورت گرفت. از هر تیمار روی لام گسترش تهیه شد. گسترش‌ها پس از خشک‌شدن با استفاده از متانول مطلق ثابت و در دمای اتاق خشک شدند. سپس رنگ آلکسافلور ۴۸۸ (۱۰μg/mL) روی نمونه‌ها ریخته شد و ۳۰دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، در محل تاریک و مرطوب نگهداری شدند. پس از این مرحله گسترش‌ها با استفاده از بافر فسفات (PBS) شسته شده، در شرایط نور بسیار

کم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر مناسب، ۱۰۰ اسپرم با بزرگ‌نمایی۴۰۰× بررسی شدند. آکروزوم‌های با رنگ یکدست، شفاف و با حاشیهٔ مشخص به عنوان پاسخ مثبت (سالم) و آکروزوم‌های با رنگ پراکنده و با حاشیهٔ نامشخص به‌عنوان پاسخ منفی (آسیب‌دیده) در نظر گرفته شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های این آزمایش با پنج تیمار و پنج تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت اندازه‌گیری‌های تکرارشده در زمان‌های صفر، ۳، ۶ و ۹ ساعت ذخیره‌سازی پس از یخ‌گشایی بررسی شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست‌آمده از رویهٔ Mixed نرم‌افزار SAS 9.2 استفاده شد. مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون دانکن و در سطح $P<۰/۰۵$ انجام شد.

نتایج

نتایج اثر مستقل ال-گلوتامین و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک، سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشای آکروزوم اسپرم پوشش‌دارشده در جدول ۱ آورده شده است. سلامت غشای آکروزوم تحت تأثیر زمان ذخیره‌سازی و ال-گلوتامین قرار نگرفت ($P>۰/۰۵$). بیشترین و کمترین تحرک اسپرم به ترتیب در سطح ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌مول ال-گلوتامین مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). بیشترین و کمترین سلامت غشای پلاسمایی به ترتیب در سطح ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌مول ال-گلوتامین مشاهده شد گلوتامین بود ($P<۰/۰۵$).

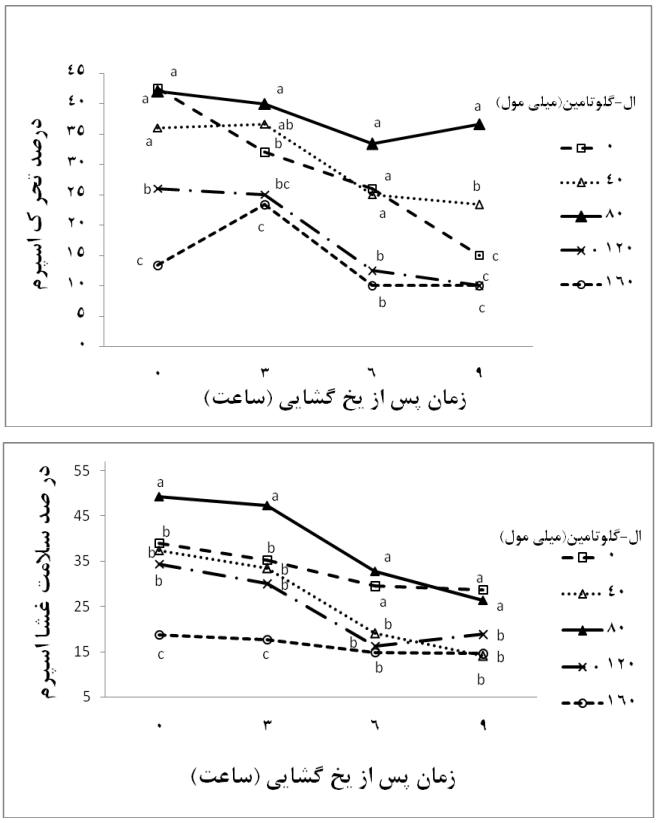
اثر متقابل ال-گلوتامین و زمان ذخیره‌سازی بعد از انجماد بر تحرک پیش‌رونده و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم معنادار بود (شکل۱، $P<۰/۰۵$). در زمان صفر، بیشترین تحرک پیش‌روندهٔ اسپرم در مقدار صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین مشاهد شد ($P<۰/۰۵$). در زمان ۳ ساعت، تحرک اسپرم در ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین بیشتر از ۴۰، ۱۲۰ و ۱۶۰ میلی‌مول ال-گلوتامین بود ($P<۰/۰۵$). پس از شش ساعت، بیشترین تحرک اسپرم در صفر و ۴۰ و ۸۰ میلی‌مول مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). در ساعت ۹ ذخیره‌سازی، بیشترین تحرک اسپرم در مقدار ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). تنها در مقدار ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین تحرک پیش‌روندهٔ اسپرم در زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی تفاوتی نشان نداد ($P>۰/۰۵$).

در زمان صفر و ۳، بیشترین سلامت غشای پلاسمایی در مقدار ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین مشاهده شد (شکل۱، $P<۰/۰۵$). در زمان ۳ و ۶، سلامت غشا در مقدار صفر و ۸۰ میلی‌مول بیشتر از سایر تیمارها بود ($P<۰/۰۵$). در زمان صفر و ۳، کمترین سلامت غشای پلاسمایی در مقدار ۱۶۰ میلی‌مول ال-گلوتامین بود ($P<۰/۰۵$).

جدول ۱. اثر مستقل ال-گلوتامین و زمان ذخیره‌سازی بر سلامت آکروزوم، سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی و تحرک اسپرم طی انجماد (LSmeans±SE)

عامل تغییر		زنده‌مانی(درصد)	سلامت آکروزوم (درصد)	تحرک (درصد)	سلامت غشای پلاسمایی (درصد)
ال-گلوتامین(میلی‌مول)	۰	۳۹/۹۵±۳/۳۷[a]	۸۳/۷۰±۱/۲۹	۲۸/۸۸±۱/۴۷[b]	۳۳/۱۰±۱/۵۵[b]
	۴۰	۴۰/۶۵±۳/۳۷[a]	۸۵/۸۵±۱/۲۹	۳۰/۲۵±۱/۴۵[b]	۲۶/۰۰±۱/۶۷[c]
	۸۰	۴۵/۹۵±۳/۳۷[a]	۸۵/۸۵±۱/۲۹	۳۸/۰۰±۱/۴۱[a]	۳۸/۹۵±۱/۴۸[a]
	۱۲۰	۳۶/۷۵±۳/۳۷[ab]	۸۲/۹۰±۱/۲۹	۱۸/۳۸±۱/۳۳[c]	۲۴/۸۵±۱/۵۱[c]
	۱۶۰	۳۰/۴۰±۳/۳۷[b]	۸۳/۰۵±۱/۲۹	۱۴/۱۷±۱/۵۳[d]	۱۶/۴۵±۱/۴۸[d]
زمان ذخیره‌سازی (ساعت)	۰	۴۵/۹۲±۰/۰۱[a]	۸۶/۳۲±۱/۱۵	۳۱/۹۷±۱/۲۰[a]	۳۵/۷۳±۱/۴۲[a]
	۳	۳۸/۲۰±۰/۰۱[ab]	۸۴/۵۶±۱/۱۵	۳۱/۴۰±۱/۲۶[a]	۳۲/۷۲±۱/۴۶[a]
	۶	۳۶/۷۲±۰/۰۱[ab]	۸۲/۴۸±۱/۱۵	۲۱/۳۷±۱/۲۸[b]	۲۲/۴۷±۱/۲۸[b]
	۹	۳۴/۱۲±۰/۰۱[b]	۸۳/۷۲±۱/۱۵	۱۹/۰۰±۱/۴۲[b]	۲۰/۵۶±۱/۳۴[b]

[a-C]:حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار است ($P<۰/۰۵$).



شکل ۱. اثر متقابل ال-گلوتامین و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک پیش‌رونده و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم (LSmeans ± S.E). حروف غیرمشابه ($^{a-d}$) در هر زمان نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار است ($P<۰/۰۵$)

بحث

نتایج اثر مستقل ال-گلوتامین بر زنده‌مانی اسپرم پوشش‌دارشدهٔ قوچ نشان داد (جدول۱) که بین سطوح صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین تفاوتی وجود ندارد (به ترتیب ۳/۳۷±۳۹/۹۵، ۳/۳۷±۴۰/۶۵ و ۳/۳۷±۴۵/۹۵). از طرفی بیشترین سلامت غشای پلاسمایی تا ۳ ساعت بعد از یخ‌گشایی در مقدار ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین وجود داشت. به علاوه تحرک اسپرم در مقدار ۸۰ میلی‌مول در مقایسه با سایر تیمارها مطلوب‌تر بود و ۹ ساعت پس از یخ‌گشایی بیشترین تحرک اسپرم در مقدار ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین مشاهده شد. بنابراین به نظر می‌رسد افزودن ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین به رقیق‌کنندهٔ تریس- گلیسرول (۵ درصد) سبب بهبود ماندگاری اسپرم پوشش‌دارشدهٔ قوچ در روند انجماد می‌شود. تاکنون گزارشی مبنی بر اثر مقادیر ال-گلوتامین به‌عنوان سرما محافظ بر ماندگاری اسپرم منجمد قوچ منتشر نشده ولی مشخص شده است مقدار ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۴۰، ۸۰ و ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین به‌ترتیب سبب بهبود ماندگاری اسپرم گاو (Amirat-Briand *et al*., 2009)، سگ (Bencharif *et al*., 2010)، گوزن (Al Ahmad *et al*., 2008)، نریان (Trimeche *et al*., 1999)، انسان (Renard *et al*., 1996) و الاغ (Li *et al*., 2003) در روند انجماد شده است. استفاده از ایزوتوپ رادیواکتیو ال-گلوتامین مشخص کرد که غشای پلاسمایی اسپرم دربرابر ال-گلوتامین نفوذناپذیر است. بنابراین حضور ال-گلوتامین در رقیق‌کنندهٔ منی سبب ایجاد فشار اسمزی می‌شود (Khlifaoui *et al*., 2005). مشخص شده است در روند انجماد رقیق‌کننده‌های هیپرتونیک در مقایسه با رقیق‌کننده‌های هیپوتونیک عملکرد بهتری در حفظ اسپرم دارند (Watson *et al*., 1990) و اغلب رقیق‌کننده‌های توصیه‌شده برای نگهداری اسپرم هیپرتونیک هستند (Fiser *et al*., 1981). همچنین مطالعات نشان داده است که احتمالاً جایگاه‌هایی در سطح غشای پلاسمایی اسپرم برای اتصال به ال-گلوتامین وجود دارد (Kruuv & Glofcheski, 1992) و ممکن است نیروهای الکترواستاتیک در برهم‌کنش

گروه‌های فسفات موجود در فسفولیپید غشا و این اسید آمینه باردار دخالت داشته باشد (Kundu *et al*., 2001). به نظر می‌رسد اسیدآمینهٔ گلوتامین به‌صورت لایه‌ای در سطح غشای اسپرم قرار می‌گیرد (Kundu *et al*., 2001). اثر حمایتی لایهٔ پوششی ال-گلوتامین روی اجزای تشکیل‌دهندهٔ غشا مانعی در برابر از هم گسیخته‌شدن این بخش از سلول در روند سردسازی و انجماد است (Amirat-Briand *et al*., 2009). به علاوه مشخص شده است اسیدهای آمینه، آنتی‌اکسیدان‌های مهم هستند (Al Ahmad *et al*., 2008) و گلوتامین با اثر بر آنزیم کاتالاز سبب حفاظت بیشتر از آکسونم و میتوکندری اسپرم قوچ در روند انجماد می‌شود (Bucak *et al*., 2009). احتمال دارد بهبود عملکرد اسپرم پوشش‌دارشدهٔ قوچ در آزمایش حاضر نتیجهٔ اثر آنتی‌اکسیدانی ال-گلوتامین یا اثر محافظتی آن بر غشای اسپرم باشد.

در تحقیق حاضر نتایج اثر مستقل ال-گلوتامین نشان داد که زنده‌مانی اسپرم در سطح ۱۶۰ میلی‌مول ال-گلوتامین کمتر از زنده‌مانی اسپرم در سطح صفر میلی‌مول ال-گلوتامین بود. بنابراین غلظت ۱۶۰ میلی‌مول ال-گلوتامین سبب کاهش زنده‌مانی اسپرم پوشش‌دارشده طی روند انجماد و یخ‌گشایی می‌شود. به علاوه تا ۳ساعت پس از یخ‌گشایی، کمترین سلامت غشای پلاسمایی در غلظت ۱۶۰ میلی‌مول مشاهده شد (شکل۱). همچنین بلافاصله پس از یخ‌گشایی، کمترین تحرک پیش‌رونده در غلظت ۱۶۰ میلی‌مول ال-گلوتامین وجود داشت. در نتیجه به نظر می‌رسد غلظت‌های زیاد ال-گلوتامین (۱۶۰ میلی‌مول) در رقیق‌کنندهٔ تریس-گلیسرول نه‌تنها باعث بهبود ماندگاری اسپرم قوچ نمی‌شود، بلکه سبب بروز اثر مخرب بر ساختار و عملکرد آن می‌شود. گزارش شده است که غلظت بیشتر از ۱۶۰ میلی‌مول ال-گلوتامین سبب کاهش تحرک اسپرم الاغ می‌شود (Trimeche *et al*., 1996). همچنین استفاده از ۱۲۰میلی‌مول ال-گلوتامین باعث بروز اثر مخرب در اسپرم گاو شده است (de Mercado *et al*., 2009). به علاوه غلظت‌های بیشتر از ۱۰۰میلی‌مول ال-گلوتامین با اعمال تنش اسمزی اثر مخرب بر اسپرم نریان (Kruuv & Glafcheski, 1992) و انسان (Trimeche *et al*., 1996) دارد. به علاوه آثار مضر و حتی سمی آنتی‌اکسیدان‌ها در غلظت‌های بالا به روشنی نشان داده شده است (Trimeche *et al*., 1996; Aurich, 2005; de Mercado *et al*., 2009). از طرفی تغییرات حجم سلول در هنگام انجماد و یخ‌گشایی به واسطهٔ افزایش غلظت مواد سرمامحافظ باعث تشدید اختلالات غشا می‌شود (Bredderman and Foote., 1969; Hammerstedt *et al*., 1990). بنابراین افزایش غلظت ال-گلوتامین بیش از ۸۰ میلی‌مول در رقیق‌کننده‌های منی قوچ احتمالاً با ایجاد آثار سمی و اسمزی سبب بروز خسارت‌های مخرب در اسپرم قوچ می‌شود.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد تحرک اسپرم و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم پس از یخ‌گشایی در تیمار ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین در مقایسه با سایر تیمارها در وضعیت بهتری بود. مشخص شده است که آمینواسیدهای موجود در مایع منی اثر حفاظتی خود را بر اسپرم تا ۳ ساعت پس از یخ‌گشایی اعمال می‌کنند (Smith & Graham, 1972). با گذشت زمان ذخیره‌سازی در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد سلول‌ها دچار مرگ برنامه‌ریزی‌شدهٔ سلول[2] می‌شوند. متابولیسم سلول و تولید ATP در میتوکندری سلول‌های پیر به دلیل افزایش نفوذپذیری غشای پلاسمایی کاهش می‌یابد (Purdy, 2006). کاهش ATP سبب اختلال در عملکرد غشا خواهد شد (Salamon & Maxwell., 2000). بدیهی است در زمان آسیب‌های ناشی از سرما و انجماد قبل از اینکه ساختار سلول دچار ازهم‌گسیختگی شود، عملکرد اجزای سلول به‌تدریج کاهش می‌یابد (Mortimer, 1994). به هر حال با توجه به نتایج تحقیق حاضر پیشنهاد می‌شود اثر ال-گلوتامین بر باروری منی منجمد قوچ در شرایط مزرعه بررسی شود.

نتیجه‌گیری کلی

افزودن ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین به رقیق‌کنندهٔ تریس-گلیسرول (۵ درصد) به منظور انجماد منی سبب بهبود تحرک اسپرم پوشش‌دارشدهٔ قوچ تا ۹ ساعت پس از یخ‌گشایی شد، ولی افزودن ۱۶۰ میلی‌مول ال-گلوتامین به رقیق‌کنندهٔ تریس-گلیسرول بر اسپرم پوشش‌دارشدهٔ قوچ در روند انجماد ویخ‌گشایی اثر مخرب داشت.

1. Apoptosis

REFERENCES

1. Al Ahmad, M. Z., Chatagnon, G., Amirat-Briand, L., Moussa, M., Tainturier, D., Anton, M. & Fieni, F. (2008). Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 429-436.
2. Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Bel Hadj Ali, H., Destrumelle, S., Desherces, S., Schmidt, E., Anton, M. & Tainturier, D. (2009). Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: preliminary results. *Theriogenology*, 71, 1209-1214.
3. Aurich, C. (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 89, 65-75.
4. Bencharif, D., Amirat, L., Pascal, O., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M. L., Barriere, P., Larrat, M. & Tainturier D. (2010). The advantages of combining LDL (low density lipoproteins) with glutamine for the cryopreservation of canine semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 189-200.
5. Bergeron, A. & Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 1338-1344.
6. Bredderman, P. J. & Foote, R. H. (1969). Volume of stressed bull spermatozoa and protoplasmic droplets, and the relationship of cell size to motility and fertility. *Journal of Animal Science*,28, 496-501.
7. Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sarıözkan, S. & Ulutaş, P. A. (2009). Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research*, 81, 13-17.
8. Cseh, S., Faigl, V. & Amiridis, G.S. (2012). Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Anim. Reprod. Sci*, 130, 187-92.
9. de Leeuw, A. M., den Daas, J. H. & Woelders, H. (1991). The fix vital stain method simultaneous determination of viability and acrosomal and status of bovine spermatozoa. *Journal of Andrology*, 12, 112-118.
10. de Mercado, E., Hernandez, M., Sanz, E., Rodriguez, A., Gomez, E., Vazquez, J. M., Martinez, E. A. & Roca, J. (2009). Evaluation of L-Glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 115, 149-157.
11. De Pauw, I. M. C., Van Soom, A., Maes, D., Verberckmoes, S. & de Kruif, A. (2003). Effect of sperm coating on the survival and penetrating ability of in vitro stored bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 59, 1109-1122.
12. Fiser, P. S., Ainsworth, L. & Langford, G. A. (1981). Effect of osmolality of skim-milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 18, 399-403.
13. Forouzanfar, M., Fazilati, M., Hosseini, S. M., Moulavi, F., Hajian, M., Salehi, S. A., Rabiei, A. & Nasr-Esfahani, M. H. (2007). Investigation of different glycerol and egg yolk concentration on freezing Bakhtiari ram semen. *Journal of Iranian Anatomical Sciences*, 5, 17-25. (In Farsi)
14. Hammerstedt, R. H., Graham, J. K. & Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11, 73-88
15. Jeyendran, R. S., Van der ven, H. H. & Zaneveld, L. J. (1992). The hypoosmotic swelling test: an update. *Archives of Andrology*, 29, 105-116.
16. Khlifaoui, M., Battut, I., Bruyas, J. F., Chatagnon, G., Trimeche, A. & Tainturier, D. (2005). Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology*, 63, 138-149.
17. Kruuv, J. & Glofcheski, D. J. (1992). Protective effects of amino acids against freeze-thaw damage in mammalian cells. *Cryobiology*, 29, 291-295.
18. Kundu, C. N., Das, K. & Majumder, G. C. (2001). Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiology*, 42, 21-27.
19. Li, Y., Si, W., Zhang, X., Dinnyes, A. & Ji, W. (2003). Effect of amino acids on cryopreservation of cynomologus monkey (Macaca fascicularis) sperm. *American Journal of Primatology*, 59, 159-165.
20. Mohammadi-Nohdehy, A. & Roostaei-Ali Mehr, M. (2013). Effect of Egg Yolk and Cooling on Storage of Ram Coated Spermatozoa. *Journal of Studies of Animal Sciences Iran*, 5, 77-83.
21. Manjunath, P. & Thérien, I. (2002). Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*, 53, 109-119.
22. Mortimer, D. (1994). Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reproduction, Fertility and Development*, 6, 25-31.
23. Parks, J. E. & Graham, J. K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38, 209-222.

24. Purdy, P. H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63, 215-225.
25. Renard, P., Grizard, G., Griveau, J. F., Sion, B., Boucher, D. & Le Lannou, D. (1996). Improvement of motility and fertilization potential of post-thaw human sperm using glutamine. *Cryobiology*, 33, 311-319.
26. Roostaei-Ali Mehr, M. & Sharafi, F. (2013). The effect of seminal plasma on the quality of coated ram frozen-thawed spermatozoa. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 14, 305-312.
27. Salamon, S. & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 77-111.
28. Smith, J. D. & Graham, E. F. (1972). Free amino acids in ram seminal plasma. *Journal of Animal Science*, 3, 601-604.
29. Trimeche, A., Renard, P., Le Lannou, D., Barriere, P. & Tainturier, D. (1996). Improvement of motility of post-thaw poitou jackass sperm using glutamine. *Theriogenology*, 45, 1015-1027.
30. Trimeche, A., Yvon, J. M., Vidament, M., Palmer, E. & Magistrini, M. (1999). Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 52, 181-191.
31. Varisli, O., Uguz, C., Agca, C. & Agca Y. (2009). Motility and acrosomal integrity comparisions between ejaculated and epididimal ram sperm after exposure to a range of anisosmotic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Animal Reproduction Science*, 110, 256-268.
32. Watson, P. F. (1990). Artificial insemination and the preservation of semen. In: Marshall's Physiology of Reproduction. *Reproduction in the male*. Lamming G.E, (Ed). Churchill Livingston. (pp, 747-869).